COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TURNOVER PROTEICO EM CÃES IDOSOS

LETICIA G. PACHECO*[1], CAMILA GOLONI[1], LUDMILLA G. DI SANTO[1], AULUS C. CARCIOFI[1]

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal
Contato: legrazy@gmail.com

Resumo: Determinado pelo balanço das reações de síntese e degradação, o turnover proteico (TP) corresponde às necessidades de proteína do animal em determinado status fisiológico. Foram comparados dois métodos de determinação do *turnover* proteico utilizando compostos marcados: ^{13}C-Leucina e ^{13}C-Fenilalanina. Para estudo do fluxo (Q), síntese (S) e degradação (B) proteicos o primeiro método, considerado padrão, analisa gás expirado e plasma sanguíneo e o segundo apenas o gás expirado. Foram coletados sangue e gás expirado de seis cães machos idosos nos tempos basal e a cada 30 minutos ao longo de 4 h durante e após a aplicação de solução isotópica. As taxas de Q (3,93±0,75 e 3,48±0,85g/kg/d), S (3,72±0,59 e 3,21±0,53g/kg/d) e B (3,92±0,62 e 3,46±0,54g/kg/d) foram semelhantes ($p>0,05$) para os dois métodos. Na estatística Bland Altman e Correlação de Pearson foi verificada relação entre ^{13}C-Leucina e ^{13}C-Fenilalanina na estimativa de Q (viés= 0,45; r=0,58; acurácia do viés=0,843), S (viés= 0,51; r=0,50; acurácia do viés=0,794) e B (viés= 0,46; r=0,58; acurácia do viés=0,83). Apesar de serem estatisticamente semelhantes e terem acurácias aceitáveis, os baixos valores na correlação de Pearson remetem à necessidade de mais estudos para validar os resultados obtidos.
Palavras Chave: carbono 13, plasma, oxidação, síntese, degradação

COMPARISON OF METHODS TO STUDY PROTEIN TURNOVER IN AGING DOGS

Abstract: Stablished by the balance of synthesis and degradation reactions, protein turnover (PT) corresponds to the protein needs of the animal in determined physiological condition. The present study compared two methods of PT evaluation, using labeled compounds: ^{13}C-Leucine and ^{13}C-Phenylalanine. For study of protein flow (Q), synthesis (S) and breakdown (B) the first method, considered standard, analyzes expired gas and blood plasma and the second only the expired gas. Blood and expired gas were collected from six aging male dogs at baseline, and every 30 minutes for 4 h during and after isotope application. Rates of Q (3.93±0.75 and 3.48±0.85g/kg/d), S (3.72±0.59 e 3.21±0.53g/kg/d) e B (3.92±0.62 e 3.46±0.54g/kg/d) were similar ($p>0.05$) for both methods.At the Bland Altman and Pearson correlation statistics, the a relationship among the estimates of ^{13}C-Leucine and ^{13}C-Phenylalanine was verified for Q (bias=0.45, r=0.58 bias accuracy=0.843), S (bias=0.51, r=0.50, bias accuracy=0.794), and B (bias =0.46, r=0.58, bias accuracy=0.83). Although the results was statistically similar and presented acceptable accuracy, the low values of Pearson correlation point to the need for further studies to validate the results obtained.
Keywords: carbon 13, plasma, oxidation, synthesis, breakdown

Introdução: As taxas de *turnover* proteico corporal geralmente são altas apenas na fase de crescimento, porém há diversos fatores decorrentes de processos fisiológicos ou patológicos que podem interferir nesta taxa, como a realização de exercícios de resistência (hipertrofia) e perda de massa muscular decorrente do processo de envelhecimento (sarcopenia) ou doenças (caquexia) (Wolfe e Chinkes, 2005). O emprego de métodos não invasivos para determinar necessidades nutricionais e *turnover* proteico, utilizando isótopos estáveis é realidade em nutrição humana. No entanto, apesar de não serem novos, estes ainda foram pouco explorados para fins de nutrição em cães, especialmente com vistas à compreensão de alterações fisiológicas da senilidade. Foram comparados dois traçadores para quantificação do *turnover* proteico corporal de cães, um mais invasivo por necessitar de sangue (^{13}C-Leucina) e o outro minimamente invasivo por necessitar apenas de gás expirado (^{13}C-Fenilalanina).

Material e Métodos: Foram utilizados 6 cães idosos (12,7±2,63 anos; 13,65±0,59 kg), alimentados com alimento extrusado em quantidade ajustada para manutenção do peso corporal constante. Os cães receberam o alimento durante 33 dias, do dia 1 ao 10 para adaptação, dias 11 ao 15 para o ensaio da fenilalanina (gás expirado; avaliação pós prandial), dias 16 a 32 intervalo para washout do isótopo e dia 33 para o ensaio da Leucina (gás expirado e plasma; avaliação em jejum). A ^{13}C Fenilalanina foi fornecida misturada a pequena quantidade de alimento úmido e a ^{13}C Leucina foi fornecida em bolus por via endovenosa periférica, ambos a cada 30 minutos por 3 horas. Amostras de plasma e gás expirado (tomadas com uso de máscaras) foram colhidas a cada 30 minutos ao longo de 4 h durante e após a aplicação, para acompanhar a incorporação do composto ao animal. O plasma foi armazenado a -80ºC e o gás expirado em temperatura ambiente com leitura realizada até duas semanas depois da coleta. O enriquecimento isotópico foi avaliado em espectrômetro de massas de razão isotópica acoplado a analisador elementar (IRMS-EA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e os resultados aplicados em equações de fluxo, síntese e degradação proteicas (Picou e Taylor-Roberts (1969): Q = O (ou E) + S = I + B; onde: Q é o fluxo proteico corporal ou fluxo do traçador ($\mu mol.kg^{-1}.d^{-1}$); O é a oxidação do aminoácido medido através do gás expirado; S é a taxa de síntese proteica; I é a ingestão de N da dieta e B a taxa de degradação proteica. Os métodos foram comparados por correlação de Pearson e análise de Bland e Altman ($P<0,05$).

Resultado e Discussão: As concentrações de ^{13}C durante o ensaio foram maiores no plasma ($P<0,05$), porém semelhante ao valor obtido nas amostras de gás expirado. As medidas de fluxo de aminoácidos (Q), síntese (S) e degradação (B) proteica não diferiram entre métodos (Tabela 1). Os limites de concordância segundo Bland e Altman (Figura 1) dos valores de Q apresentaram viés de 0,45 e variação de -1,01 e 1,91 g/kg/dia com

concordância de 0,50 e acurácia do viés de 0,80. Para S, viés de 0,51 e variação de -1,04 e 2,07 g/kg/dia com concordância de 0,40 e acurácia do viés de 0,79Para B obteve-se entre métodos viés de 0,46 e variação de -1,00 a 1,92 g/kg/dia com concordância de 0,49 e acurácia do viés de 0,83. Apesar dos resultados com cada traçador serem estatisticamente semelhantes e terem acurácias aceitáveis, os baixos valores na correlação de Pearson remetem à necessidade de mais estudos para validar os resultados obtidos. As pesquisas com *turnover* proteico são bastante limitadas, ao trabalhar com diferentes teores de proteína para cães idosos, Williams et al. (2001) empregado como traçador ^{15}N Glicina encontraram valores de 2,4 a 12,7 g/kg/dia de síntese e 2,7 a 12,8 g/kg/d de degradação, demonstrando grande variação individual depende, principalmente, da quantidade de proteína ingerida. Comparando-se os resultados obtidos com a dieta que apresentava teor proteico semelhante à utilizada no presente estudo, as taxas de síntese e degradação são compatíveis.

Tabela 1. Taxas de fluxo, síntese e degradação proteicas calculadas com dois traçadores do *turnover* proteico*.

Métodos	Fluxo	Síntese	Degradação
	g/kg/d		
^{13}C Leucina	3,93±0,75	3,72±0,59	3,92±0,62
^{13}C Fenilalanina	3,48±0,85	3,21±0,53	3,46±0,54
P-valor	0,10	0,09	0,09

*Valores calculados com amostras de sangue e gás expirado.

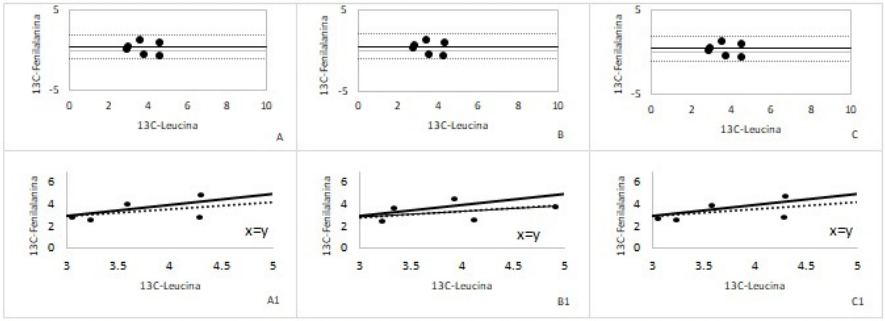


Figura 1. Comparação Bland e Altman e correlação de Pearson de fluxo, síntese e degradação proteicas (g/kg/dia) estabelecida entre os traçadores ^{13}C-Leucina e ^{13}C-Fenilalanina: A e A1 representam o fluxo (n=6; r=0,58); B e B1 as síntese (n=6; r=0,50); C e C1 a degradação proteica (n=6; r=0,58).

Conclusão: Os métodos com os dois traçadores foram satisfatoriamente executáveis e apresentaram resultados coerentes. É necessário, no entanto, se avaliar o porquê da reduzida correlação de Pearson, que sugere variabilidade entre animais nas medidas obtidas. A ^{13}C-Fenilalanina tem maior potencial para uso em populações específicas, como animais domiciliados pois não necessita de coletas seriadas de sangue.

Agradecimentos: Ao Centro de Isótopos Estáveis Prof.º Dr. Carlos Ducatti – Botucatu, à Neovia Goup, à Affinity PetCare, ao CNPq.

Referências Bibliográficas: Wolfe RR. Regulation of skeletal muscle protein metabolism in catabolic states. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006; 8:61-65; Wolfe, R. R., & Chinkes, D. L. (2005). Isotope tracers in metabolic research: principles and practice of kinetic analysis. John Wiley & Sons; Picou, D., & Taylor-Roberts, T. (1969). The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. Clinical Science, 36, 283-296; Williams, C. C., Cummins, K. A., Hayek, M. G., & Davenport, G. M. (2001). Effects of dietary protein on whole-body protein turnover and endocrine function in young-adult and aging dogs. Journal of animal science, 79(12), 3128-3136.